

### 3. ウイルス第三部

部長 竹田 誠

#### 概要

令和3年度から組織が一部再編された。令和2年度まで当部は、第一室(麻疹)、第二室(風疹)、第三室(ムンプス)、第四室(インフルエンザ以外の呼吸器ウイルス感染症およびサイトカイン)で構成されていたが、これまでの第四室(インフルエンザ以外の呼吸器ウイルス感染症およびサイトカイン)が担当していた所掌事務の内、病原体(インフルエンザ以外の呼吸器ウイルス)に関するサーベイランスならびにリファレンス業務、サイトカインに関する業務は所掌事務から外れ、第四室(令和3年度より第五室)では、新型コロナワクチンなどの呼吸器ウイルスワクチンの品質管理業務が主な所掌事務となった。また、これまでインフルエンザウイルス研究センター第三室が担当していたインフルエンザワクチンに関する業務が、ウイルス第三部の所掌事務となり、ウイルス第三部の新たな第四室となった。それら組織再編に伴う人事異動が行われた。その結果、令和3年度からは、第一室(麻疹)、第二室(風疹)、第三室(ムンプス)、第四室(インフルエンザワクチン)、第五室(インフルエンザワクチン以外の呼吸器ウイルスワクチン)の5室体制となった。

当部は、麻疹、風疹、ムンプス(おたふく風邪)、インフルエンザ、新型コロナウイルス(重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2型)感染症(COVID-19)に対するワクチン、 $\gamma$ -グロブリン製剤に関する国家検定、検査、研究業務等を担当している。品質管理体制に関しては、ワクチン国家検定の標準手順書(SOP)や標準品等の整備を行い、試験法の標準化と精度管理に努めている。また、国家検定における各種品質管理の試験の実施に加えて、ワクチン製剤の国家検定に製造・記録等要約書(SLP)の審査を実施している。国際協調の観点からも、国際的にも通用する品質管理体制を取っている。感染症対策やワクチン政策に対する社会的要求が一層高まる中で、ワクチン製剤の安全性と有効性の確保と国家試験機関(NCL)としての責務を果たし、そして、国民や社会の要望に応えることを目的に業務に取り組んでいる。

サーベイランス活動では、麻疹・風疹に関しては、全国の地方衛生研究所と協力しながら全国的、ならびに世界保健機関(WHO)と連携して国際的実験室診断ネットワーク体制の構築ならびに推進に関する研究を進めている。その活動を通じて、より正確で実用的な実験室診断技術・分子疫学的手法の開発研究を推進し、日本で流行する麻疹ウイルスの詳細な調査、解析を行っている。感染症疫学センターや厚労省と協力して、2015年3月に認定を受けた麻疹排除状況がその後も継続していることを示すために貢献している。また、麻疹ウイルスに関する研究においては、ポリオウイルスに感受性を有さず麻疹ウイルスを効率よく分離できる細胞や容易にウイルスの感染を確認できる細胞の確立に関する研究、麻疹ウイルスの脳内持続感染により引き起こされることのある亜急性硬化性全脳炎に関する研究を行っている。

風疹に関しては、風疹の病原診断および解析に関する開発研究、流行ウイルス株の変遷に関する研究、風疹抗体価の読み換えに関する研究、風疹ウイルスのリバースジェネティクス技術の改良に関する研究、弱毒生ワクチンの性質決定の分子基盤を明らかにするための研究を行っている。さらに風疹ウイルスの感染・増殖を助ける宿主因子の探索などを通じて、風疹ウイルス増殖の詳細な細胞内分子機構の解析研究を実施している。

ムンプス(おたふく風邪)に関しては、ムンプスウイルスの遺伝子操作手法の開発や改良に関する研究、神経病原性の分子メカニズムに関する研究、ムンプスウイルスの増殖に関与する宿主因子に関する研究、新規ワクチンおよび治療薬の開発に関する研究を実施している。また、重要なテーマとして、ムンプスワクチンの効果や安全性を評価するための動物モデルの開発研究や、国内、海外の流行株の解析などを通じた流行実態の解明のための研究を実施している。

インフルエンザでは、インフルエンザウイルスの性状に関する研究やインフルエンザワクチンの品質管理手法の開発研究を行なっている。

呼吸器ウイルスワクチン(インフルエンザワクチンを除く)の検定・検査、並びにその検定に必要な標準品の製造・維持・管理及び交付、並びにこれらに関する研究、さらに呼吸器ウイルス(インフルエンザウイルスを除く)の病因及び病原の検索、予防診断及び治療方法の研究を行っている。特に新型コロナワクチンについてはこれまで申請されたすべての製剤について承認前検査に携っており、アデノウイルスベクターワクチンの国家検定を行っている。また、膜型セリンプロテアーゼ発現細胞やヒトプライマリ呼吸器上皮細胞の気相培養系を用い、臨床検体から急性呼吸器ウイルスを分離して収集し、全長配列解読を行っている。これまでにヒトコロナウイルス、ヒトボカウイルスやパラインフルエンザウイルス 4 型など、通常の株化培養細胞では分離が困難なウイルス株を多数分離し、遺伝子検出による検査系の評価用に用いるとともに、これらについて増殖機構や病態解明に関する研究を行っている。

国際協力では、WHO 世界麻疹風疹実験室ネットワーク(Global Measles and Rubella Laboratory Network) の Global Specialized Laboratory (GSL)として、麻疹ならびに風疹の診断や流行調査に資するための研究を遂行し、また、ムンプスウイルスなどに関しても周辺諸国の診断技術の向上のための研究協力を実施している。インフルエンザでは、WHO-ERL (Essential Regulatory Laboratory)の1つとして、国際標準試薬の制定作業や、品質管理試験の精度向上に関する共同研究に携わっている。

## 業績

### 調査・研究

#### 1. 麻疹ウイルスに関する研究

##### 1. 麻疹検査診断ネットワークの構築に関する研究

WHO 等が中心となり進めている麻疹排除計画では、検査診断に基づいた麻疹サーベイランス体制の確立を求めている。これに従い、日本では、「麻疹に関する特定感染症予防指針」を改訂し、原則、すべての麻疹疑い例に対して、ウイルス遺伝子検査と麻疹 IgM 検査の両方を実施することとしている。ウイルス遺伝子検査は、2007 年以降、感染研、レファレンスセンター、地方衛生研究所(地衛研)が共同で整備を進めてきた麻疹検査診断ネットワークの中において、主に全国の地衛研により実施され、IgM 検査は保険を利用して民間検査センタ

ー(検査センター)により実施されている。本研究は WHO の評価に資する検査診断ネットワークを構築することを目的としている。2015 年 3 月に日本は、WHO 西太平洋地域麻疹排除認証委員会により麻疹排除状態にあると認定され 2020 年までの排除維持が確認されている。2021 年においても麻疹患者の報告は 6 例のみであり国内での継続的な発生がある状態ではなく麻疹の排除状態は維持されていると考えられた。

また検査センターの協力を得て、IgM ELISA 検査結果、実態を随時、把握した。さらに検査センターに対して、麻疹 IgM 抗体、風疹 IgM 抗体に対する外部精度管理を実施し、検査施設としての適合性を示した。今後も地方衛生研究所や検査センターと協力し、より精度の高い麻疹検査診断体制を維持、改善していく。[關文緒、染谷健二、田原舞乃、大倉喬、山田裕加里、竹田誠、森嘉生、大槻紀之、麻疹・風疹レファレンスセンター、地方衛生研究所]

#### 2. ポリオウイルスレセプター (PVR) をノックアウト(KO)した PVR KO Vero/huSLAM 細胞の開発

近い将来に達成されると考えられるポリオ根絶に向けて、世界保健機関 (WHO)は各研究施設におけるポリオウイルスの取扱いに関する厳格な管理を求めている (Global Action Plan III: GAP III)。そのため、ポリオウイルス非感受性の培養細胞を作製することは、今後のウイルス学的研究を進めるために重要と考えられる。これまでに我々は、細胞化学部との共同研究で、ポリオウイルスレセプター機能をノックアウトした Vero 細胞 (Vero ΔPVR1/2) を作製した。本研究では、レトロウイルスベクターを用いて Vero ΔPVR1/2 細胞に SLAM 遺伝子を導入した Vero ΔPVR1/2 hSLAM+細胞を作出し、その性状を広汎に使用されている Vero/SLAM 細胞と比較した。野外株ベースの組換え麻疹、風疹ウイルス株に対する感受性、及び麻疹疑い、風疹疑いの患者より採取した臨床検体からのウイルス分離能を比較すると、本細胞は、Vero/SLAM 細胞と同等以上のものであることを確認できた。本細胞は、JCRB 細胞バンクに寄託されており、近日中に譲渡可能になる予定である。[染谷健二、竹田誠:中村優子、花田賢太郎(細胞化学部)]

#### 3. ウイルス感染に伴い色素発現する培養細胞の開発

ウイルスを培養細胞に感染させた場合、使用する培養細胞

と感染させるウイルスの組み合わせにより、様々な形態の CPE が観察される。一方で、ウイルスが感染したにもかかわらず、CPE が形成されない、あるいは CPE が視認しにくい事象があることも知られている。そのため、培養細胞のウイルス感染成立を顕微鏡下で容易に視認できれば、これまで検出を逃れてきたウイルスの分離も可能になると考えられる。本研究では、ウイルス感染により活性化するプロモーター下流に色素遺伝子を組み込んだウイルスベクターを構築し、アフリカミドリザル由来株化細胞に色素遺伝子を導入した。色素遺伝子導入細胞にウイルスを感染させたところ、色素の発現は確認できなかった。現在、本細胞に色素遺伝子を発現させるための改良を試みている。[染谷健二、竹田誠]

#### 4. 麻疹ウイルス HNT 株エンベロープタンパク質に関する研究

麻疹ウイルスの脳内持続感染により生じる亜急性硬化性全脳炎(SSPE)患者から分離されたウイルスは、ウイルスエンベロープタンパク質である F タンパク質及び M タンパク質のアミノ酸置換による細胞融合活性の上昇と細胞遊離ウイルス産生の減少という特徴が知られており、高い細胞融合活性により H タンパク質に依存せずに脳内受容体 CADM1 と CADM2 を利用して感染拡大することが報告されている。麻疹ウイルスの中樞神経系での増殖について理解を深めるため、ハムスターの中樞神経系に順化させた HNT 株のエンベロープタンパク質について解析を行った。HNT 株 F タンパク質発現プラスミドにより細胞融合活性を解析したところ、HNT 株 F タンパク質は SSPE 患者由来株と同程度の高い細胞融合活性を示した。また、組換えウイルスにより HNT 株 M タンパク質のウイルス産生能を解析したところ、ハムスター細胞において細胞遊離ウイルスの増加を示した。このことから HNT 株は SSPE 株と同様に高い細胞融合活性を持つ一方で、M タンパク質の機能を維持しており SSPE 株と異なる特徴を持つことが明らかとなった。さらに HNT 株 H タンパク質について解析を行ったところ、CADM2 陽性細胞株において野外株 H タンパク質より高い感染性を示し、HNT 株 H タンパク質が CADM2 を利用する可能性が示唆された。今後は、HNT 株 H タンパク質の CADM2 受容体利用能について解析を行う予定である。[關文緒、竹田誠]

#### 5. 麻疹風疹混合ワクチンの品質管理に関する研究

麻疹風疹混合ワクチンは1970年代に樹立されたワクチン株を用いて製造される生ワクチンである。生ワクチンはその開発過程や製造工程の特性上、単一クローンのウイルスで構成されている可能性は低く、ワクチンの中には解析・決定されているワクチン株遺伝子配列とは異なる遺伝子配列を有するバリエーションウイルスが一定の割合で含まれることが予想されている。本研究では次世代シーケンシング技術(NGS)を用い、国内で販売されている3社の麻疹風疹混合ワクチン中に含まれる麻疹ウイルス及び風疹ウイルスのバリエーション配列の検出を試みた。この結果麻疹・風疹ウイルスともに一定のバリエーションが存在することが確認できた。このうち麻疹ウイルスでは10%以上の混入率を有すると考えられるバリエーション配列は麻疹ウイルス遺伝子全長約15Kbpに対し2~10箇所であった。風疹ウイルスにおいては10%以上の混入率を有すると考えられるバリエーション配列は風疹ウイルス遺伝子全長約10Kbp に対し2~11箇所であったものの、混入比率が38%以上ある箇所があり混入比率の高いバリエーションが存在することが示唆された。風疹ウイルスではワクチン株の特性として温度感受性を有することが明らかとなり、今回検討した3製剤のうち2製剤のワクチン株は温度感受性決定領域遺伝子が特定されているが2株とも当該配列にはバリエーション配列を有さないことが明らかとなった。また異なるロットのMRワクチンを用いてロット間でのバリエーションの構成比率の比較を行った。この結果各社のワクチンともにロット間でのバリエーション構成比率の大きな違いはなかったものの、1製剤の風疹ウイルスの配列に1箇所のみロット間での差があった。今後より詳細な検討を行う予定である。[大槻紀之、山田裕加里;石井孝司(品質保証管理部)]

## II. 風疹ウイルスに関する研究

### 1. 風疹ウイルス流行株の分子疫学的検討

風疹の排除を達成し国際的に認証されるためには、同一ウイルスによる流行が1年以上継続せず、伝播が遮断されていることを明らかにしなくてはならない。2012年から2021年までに国内で検出された風疹ウイルス1,540株について系統樹解析を行い、流行の変遷を解析した。この期間に検出されたウイルスはすべて遺伝子型1Eもしくは2Bに分類された。また、米国CDC(Rivailler et al. 2017)の提案したLineage分類では、

これらは 1E-L2、2B-L1 および 2B-L2c に細分類された。2012-2014 年には、1E-L2 および 2B-L1 のウイルスが1年以上継続して検出され、土着伝播を引き起こしたと考えられた。2015 年以降は同一の株による流行は発生せず、土着流行は遮断されたと考えられた。2018-2020 年には 1E-L2 のウイルス (2012-2014 年の株とは別系統) が 1 年 8 ヶ月の間継続的に検出され、土着伝播を引き起こしたものと考えられた。この株は同時期に中国でも大規模流行を引き起こし、国境を越えた流行であったことが示唆される。本ウイルスは 2020 年第 12 週以降国内では検出されておらず、伝播が遮断されたものと考えられる。今回の解析により、米国 CDC の提案した風疹ウイルスの細分類法によって従来の遺伝子型分類より多くの情報を得ることができることを実証した。一方、国内のウイルスについては、分類の基準となる Lineage 内の平均 pairwise distance に当てはまらないケースも認められたことから、分類もしくは基準の見直しが必要であることが示唆された。[森嘉生、坂田真史、中津祐一郎、竹田誠、全国地方衛生研究所]

## 2. 地方衛生研究所における風疹検査の調査研究

風疹の排除認定を受けるためには、国内のサーベイランス体制が国際的な基準を満たしていることが前提となる。国内の感染症サーベイランス情報登録システムである NESID では検査陽性の情報しか登録されず、検査実施数ならびに検査陰性数の情報は得ることができない。そのため、麻疹風疹リファレンスセンターのネットワークを介して 2016 年以降、全国地方衛生研究所における検査実績を調査している。風疹の全国流行があった 2019 年には、全国で 6,839 件の検査が実施され、1,289 件が陽性であったが、2020 年は 788 件の検査実施ならびに 50 件の陽性、2021 年は 341 件の検査実施ならびに 1 件の陽性と、検査数と陽性数の大幅な減少が見られた。5 日以内に施設に搬入された症例割合および検体搬入後、検査が 4 日以内に実施された症例割合は、2019 年以前と比較して 2020 年以降は減少傾向が見られた。これは 2020 年から生じた COVID-19 の流行に伴うサーベイランス体制への影響を示している可能性があり、今後も注視する必要がある。[森嘉生、坂田真史、中津祐一郎、竹田誠、全国地方衛生研究所]

## 3. 麻疹風疹同時検査に使用可能なマルチプレックスリアルタ

### イム RT-PCR 法の開発

麻疹および風疹は鑑別が必要な発熱発疹性疾患であり、同時に検査がされることが多い。しかし、それぞれの病原体検出マニュアルに記載された方法では、同一のプレートで検査することは可能であるが、同一のウェルで検査することはできなかった。検査の簡便化、効率化を図るため、麻疹風疹検査を同一ウェルで実施できるマルチプレックス realtime RT-PCR 法の開発をおこなった。麻疹ウイルス検出用プローブの蛍光色素を FAM-TAMRA から VIC-QSY に変更した以外、現行の realtime RT-PCR 法の試薬等を使用した。構築したマルチプレックス realtime RT-PCR 法を、それぞれの参照 RNA 並びに代表ウイルス株を用いて検討を行ったところ、単独検出法と同等の感度、高い特異度があることが示された。既に麻疹ウイルスまたは風疹ウイルスが陽性であることが明らかとなっている臨床検体を用いて検討を行った場合でも単独検出法と同等の感度特異度を示した。開発したマルチプレックス realtime RT-PCR 法は、麻疹風疹それぞれの単独検出 realtime RT-PCR 法と遜色ない性能を示すことから、地方衛生研究所における麻疹風疹検査に有用であることが期待される。[森嘉生、大槻紀之、坂田真史、中津祐一郎、竹田誠、山形県衛生研究所、千葉県衛生研究所、富山県衛生研究所、愛知県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、鳥取県衛生環境研究所、沖縄県衛生環境研究所]

## 4. CPER 法による風疹ウイルスリバーシジェネティクス系の構築

Circular polymerase extension reaction (CPER)法によるリバーシジェネティクス系は PCR を技術基盤としており、ウイルスゲノムの全長 cDNA を PCR で幾つかの断片として増幅し、再度 PCR により宿主細胞に適切な発現プロモーター下に断片を連結して感染性全長 cDNA を増幅する。その増幅産物を直接細胞へ導入することで感染性ウイルスを作製する手法である。既知ウイルスの中でゲノムの GC 含量が最も高い風疹ウイルスにおいて、CPER 法によるリバーシジェネティクス系の構築が可能か検討した。以前に作製した風疹ウイルス感染性 cDNA クローン (pcHHR-HS) を鋳型として、全長 cDNA を断片として増幅した。HS の 5' と 3' の UTR 配列を付加した CMV プロモーター配列と増幅断片を鋳型にして PCR を行い、アガロース電

気泳動により全長 cDNA に相当する増幅産物(CPER-HS)が得られたことを確認した。CPER-HS と陽性コントロール (pcHHR-HS)をそれぞれ BHK 細胞へ導入し、培養上清を回収した。二次感染の有無とウイルス産生を確認するため、その培養上清を Vero 細胞へ接種した。7 日後に培養上清を回収してプラーク法により力価を測定したところ、CPER-HS を接種した上清は  $10^7$ PFU/ml を越える力価を示し、pcHHR-HS のそれと同等のウイルス産生が認められた。ゲノムの GC 含量が高い風疹ウイルスにおいても、CPER 法により既存の感染性 cDNA と同様にウイルスの作製が可能であった。CPER 法を用いることで、全長 cDNA を増幅する際の鋳型を置換する、あるいは断片増幅時のプライマーに変異を導入することで様々なキメラウイルスや点変異ウイルスの作製が可能であることが示唆された。

[坂田真史、中津祐一郎、加藤文博、加藤大志、竹田誠、森嘉生]

#### 5. 風疹ウイルスの細胞内増殖を制御する宿主因子の解明

我々はこれまでに、風疹ウイルスに対する感受性の高い培養細胞を作製することを目指し、CRISPR-Cas9 法によるゲノム編集技術を用いて、宿主インターフェロン (IFN) 応答の誘導に関わるアダプター分子である IPS-1 を欠損させたヒト肺癌由来 A549 細胞を作出し、その細胞において風疹ウイルスの複製効率が飛躍的に向上することを見出している。また、IPS-1 の上流に存在する宿主の病原体認識レセプターである RIG-I および MDA5 の両方が風疹ウイルスの認識に関与し、その増殖を抑制することも明らかにしている。一方で、実際に風疹ウイルスを直接的に抑制するエフェクター分子に関しては未解明のままであった。そこで、風疹ウイルスの増殖が亢進することが明らかとなっている IPS-1 欠損 A549 細胞を用いて、IFN 応答において多くのウイルスを抑制することが知られているインターフェロン応答遺伝子群 (IFN-stimulated genes; ISGs) を、ドキシサイクリンにより発現制御が可能な状態で導入し、風疹ウイルスを抑制する ISGs の同定を試みた。その結果、転写因子である IRF1 や、既に多くのウイルスを抑制することが知られている BST2 (別名 Tetherin) などが、風疹ウイルスの増殖を抑制する ISGs として同定できた。一方で、BST2 などの ISGs 単独では、IPS-1 欠損によるウイルス増殖の亢進の全てを十

分に説明できないことから、複数の ISGs が細胞における風疹ウイルスの抑制に協調的に寄与している可能性が考えられた。また、今回の解析では解明できていない、他のウイルスではまだ報告されていない ISGs が、風疹ウイルスの抑制に関与している可能性も考えられた。今後は、それらの可能性について詳細に解析していく予定である。[中津祐一郎、坂田真史、竹田誠、森嘉生]

#### 6. 風疹ウイルスの細胞侵入に必須な宿主因子の探索

風疹ウイルスの細胞侵入に必要な宿主因子の探索を行うため、CRISPR/CAS9 による網羅的ノックアウトスクリーニングを行なったところ、脂質代謝に関する宿主因子が同定された (未公開)。本遺伝子をノックアウトした細胞では、風疹ウイルスの細胞侵入が著しく低下していることを前年度までに明らかにした。このノックアウト細胞では、ウイルスの膜融合過程における脂質の混合は生じるが、その後のヌクレオキャプシドの細胞質への放出がほとんど生じないことを明らかにした。このことは同定した宿主因子が風疹ウイルスの膜融合による膜孔の形成に重要であることを示唆するものであり、ウイルスの膜融合の理解に新たな知見を示すものと考えられた。[森嘉生、坂田真史、中津祐一郎、竹田誠、酒井祥太 (細胞化学部)、花田賢太郎 (品質保証・管理部)、岡本徹、松浦善治 (大阪大学微生物病研究所)]

### III. ムンプスウイルスに関する研究

#### 1. ムンプスウイルスの迅速かつ簡便なリバースジェネティクス法の開発

ムンプスウイルスのリバースジェネティクスを行うには約 15kb の全長ゲノムをプラスミドに導入し、大腸菌を用いて、クローニングする必要がある。そのため、変異導入に時間がかかることや、配列によっては大腸菌での維持が難しい場合があることが問題となっていた。本研究では PCR または OriCiro Cell-Free Cloning System を用いて、大腸菌を使用せず、従来法よりも迅速にムンプスウイルスの全長ゲノムを構築する手法の確立を目指した。ウイルスゲノム断片を、PCR または OriCiro Cell-Free Cloning System を用いて、5 末端に T7 プロモーター配列を付加した上で連結させた。得られた全長ゲノムをヘルパープラスミドと共に T7 ポリメラーゼ発現 BHK 細胞に導入

した。その結果、従来のプラスミドを用いた場合と同様に、感染性ウイルスを得ることができた。一方、全長ゲノムの構築にかかった時間は従来法に比べて有意に短縮された。迅速かつ簡便にウイルスの全長ゲノムを構築することは新興感染症が発生した際に、より早く研究に着手できるという点でも非常に有用であると考えられる。[裴彩元、加藤大志、若田愛加、坂田真史、加藤文博、竹田誠]

## 2. 鳥居株感染性クローンを用いた、ムンプスワクチンに含まれるバリエーションの神経病原性解析

ワクチン株に含まれるバリエーションが神経毒性に影響を及ぼしているか明らかにするために、ワクチン株である鳥居株の感染性分子クローンにバリエーションに含まれるいくつかの変異を挿入した変異体を作製し、プラークサイズや増殖能を解析した。また新生ラットを用いた神経病原性の解析により、性状に影響を及ぼす責任変異の箇所をある程度絞り込むことに成功した。[加藤文博、加藤大志:須崎百合子、網康至(動物管理室)、木所稔(品質保証管理部)、竹田誠]

## 3. ムンプスワクチン接種非ヒト霊長類における自然免疫系の解析

ムンプスワクチン接種カニクイザルにおいて、自然免疫系の解析系を行った。様々な種のワクチンを接種した計 20 頭のカニクイザルから末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離し、フローサイトメトリーにてリンパ球サブセットの解析を行った。また、ワクチン接種後に野生株にて攻撃接種し、PBMC からウイルスの N および HN 抗原を標的とした抗体を用いフローサイトメトリーにて抗原検出を試みた。その結果、防御に相関した T 細胞サブセットの割合がやや上昇していることが認められた。[加藤文博、加藤大志、裴彩元:須崎百合子、網康至(動物管理室)、木所稔(品質保証管理部)、竹田誠]

## 4. ムンプスウイルス感染における USE1 の役割

ムンプスウイルスの感染後期過程に関与する宿主因子を明らかにするために、F タンパク質および HN タンパク質の細胞質領域に近接する宿主因子を近接依存性標識法によって、網羅的に同定した。質量分析の結果、638 個の宿主タンパク質が得られ、それらのタンパク質間相互作用ネットワークを描出

した。siRNA スクリーニングおよび免疫沈降の結果から、SNARE サブファミリータンパク質である USE1 が F タンパク質に特異的に結合し、膜融合およびウイルス増殖に必須であることを見出した。さらに、USE1 は F タンパク質の N 型糖鎖の付加に重要な役割を担っていることが明らかになった。[劉亜軽、加藤大志、裴彩元、若田愛加、加藤文博、坂田真史、竹田誠、関塚剛史(病原体ゲノム解析研究センター)、山地俊之(細胞化学部)]

## 5. 抗ムンプスウイルス薬候補 CD437 の性状解析および抗ウイルスメカニズム解明

ムンプスウイルスに対し、抗ウイルス活性を有する化合物探索のために、GFP 発現組換えムンプスウイルスを用いた高効率スクリーニング系を構築した。1120 種からなる薬理活性既知の化合物ライブラリーからスクリーニングを行った結果、レチノイド受容体アゴニストである CD437 が抗おたふくかぜウイルス活性を有することが明らかになった。またムンプスウイルス以外のパラミクソウイルスとして麻疹ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型および 3 型、RS ウイルスについて抗ウイルス活性を測定したところ、いずれのウイルスに対しても効果が確認された。CD437 はレチノイド受容体アゴニストとして報告されているが、他のレチノイド受容体アゴニストにおいて抗ウイルス活性が認められなかったこと、および、関連因子である RIG-I を欠損させた細胞株において抗ウイルス活性を発揮したことから、従来考えられていた機序とは異なる機序で抗ウイルス活性を発揮していることが推測された。また、ウイルス複製過程の後期過程に作用していることが明らかとなった。[加藤文博、中津祐一郎、村野けい子:山地俊之(細胞化学部)、若田愛加、久保田耐、木所稔(品質保証管理部)、加藤大志、竹田誠]

## 6. ウイルス-宿主インタラクトーム解析結果に基づく新規抗ウイルス化合物探索

インタラクトーム解析によりムンプスウイルス複製に関与すると考えられる宿主因子を標的とした化合物を探索するために、宿主因子に相互作用があると目される化合物の情報を収集し、構造活性相関により候補化合物の絞り込みを行った。得られた候補化合物の抗ムンプスウイルス活性を評価したところ、HSP90 やサイクリン依存性キナーゼ (CDK) に対し薬理活性

を示す化合物がヒット化合物として得られた。これら化合物について半数阻害濃度および半数細胞毒性濃度を測定した結果、それらの比(選択域)が 1000 以上のものが複数含まれることが明らかになった。さらに一部を麻疹ウイルスおよびセンダイウイルスにおいて抗ウイルス活性を評価した結果、CDK 阻害剤においてはムンプスウイルスと同等の抗ウイルス活性を示すことが明らかになった。一方、HSP90 阻害剤においてはセンダイウイルスに対し若干効果の弱化が見られた。[加藤文博、中津祐一郎、坂田真史、関塚剛史(病原体ゲノム解析研究センター)、山地俊之(細胞化学部)、裊彩元、若田愛加、加藤大志、竹田誠]

#### 7. ムンプスウイルス感染における核小体タンパク質の役割

パラミクソウイルス科の Matrix(M)タンパク質は、主に細胞質においてウイルスの粒子形成や出芽時に中心的な役割を担う。また M タンパク質は核局在・核外輸送シグナルを持つことから、核小体に局在する特徴をもっている。核小体はリボソーム生合成の場であるが、B23 をはじめとする核小体タンパク質が様々なウイルスタンパク質との相互作用を介して、ウイルス感染制御に関与することが明らかになってきた。ムンプスウイルス(MuV)の感染細胞では M タンパク質が核小体に局在することから、ウイルスが増殖する過程で核小体を利用している可能性が高い。そこで本研究では、核小体が MuV 感染にどのように関わっているのかを調べるために、これまでにウイルス感染との関与が報告された 6 種類の核小体タンパク質の siRNA を用いて、MuV の増殖性に影響する因子を調べた。その結果、トリーチャーコリンズ症候群の主な原因遺伝子である TCOF1 がコードする Treacle の発現を抑制すると、培養上清中のウイルス力価が 10~100 倍低下することがわかった。さらに、single-step growth assay により Treacle の発現を抑制した細胞ではウイルス RNA やタンパク質合成能は正常であるにも関わらず、最終的な上清中のウイルス力価が低下していることから、ウイルス粒子形成や出芽過程に異常を来していることが示唆された。興味深いことに、MuV 感染細胞の核小体では、一部の M タンパク質が Treacle と共局在していた。また、M タンパク質および Treacle の発現ベクターをコトランスフェクションした細胞を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、Treacle は M タンパク質と共沈殿した。以上の結果より、核小

体タンパク質である Treacle は MuV 感染の後期過程に重要な宿主因子であり、このメカニズムには M タンパク質および Treacle の相互作用が関与する可能性が示唆された。[若田愛加、加藤文博、加藤大志、竹田誠]

#### 8. イヌジステンパーウイルスに対する抗ウイルス薬剤探索

パラミクソウイルス科モリビリウイルス属に属するイヌジステンパーウイルス (CDV) は、犬に対して致死的な病気を引き起こす。将来的なヒトへの伝播の可能性が示されていることから、あらかじめ対策を強化すべきウイルスである。本研究では、将来的な流行時にも迅速に対応できるよう、すでに他の病気に対して承認されている FDA 承認化合物ライブラリーにおいて、抗 CDV 活性の有無について細胞変性効果を指標としたスクリーニング法で評価した。その結果、10 化合物が一次ヒット化合物として見出された。次に化合物の抗ウイルス活性における濃度依存性を評価したところ、4 化合物が濃度依存的に抗ウイルス活性を示した、[加藤文博、關文緒、大槻紀之、裊彩元、若田愛加、加藤大志、竹田誠]

### IV. 急性呼吸器ウイルス感染症に関する研究

#### 1. リアルタイム RT-PCR 法による SARS-CoV-2 検出法(感染研法)のプライマー・プローブ配列における VOC に対するミスマッチ検索

2019 年 12 月末に中国武漢で重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2(SARS-CoV-2)による肺炎が発生して間もなく、2020 年 1 月中には Corman らが開発した N タンパク質を標的とするセット(N1 セット)と我々で開発した N2 セット(NIID-N2)を用いたリアルタイム RT-PCR 法による検出法をセットアップし、病原体検出マニュアルを公開した。Corman の N1 セットは感度があまりよくなく WHO 法から削除されたため、新たに S タンパク質領域を対象とするセット(NIID-S2)を開発し、地衛研・感染研用として病原体検出マニュアルを更新し、現在の感染法は NIID-N2、NIID-S2 の 2 つのセットを用いることになっている。2020 年末に変異株(Variant of Concern, VOC)であるアルファ株が出現して以来、次々と新たな VOC が発生し、流行の置き換わりが発生している。武漢株はアルファ株に置き換わったが、2021 年半ばにはデルタ株に置き換わり、2022 年初頭にオミクロン株に置き換わり、現在はオミクロン株の中で亜型

の置き換わりが進んでいる。リアルタイム RT-PCR による検出系の性能を担保するためには、プライマー・プローブの対象配列におけるミスマッチの存在をモニタリングする必要がある。公的データベースである GISAID に登録されている配列を用いて解析を行い、変異導入テンプレートをを用いた解析を行ったところ、いくつかのミスマッチは感度に影響するが、ほとんどのミスマッチは感度に影響しないと考えられた。武漢株の末期には全体登録配列の 2-3%にミスマッチがみられる状況になっていたが、アルファ株への置き換わりとともにミスマッチ率も減少し、1%程で推移していた。デルタ株でもおおむね 1%程で推移していたが、2021 年末に国内で N2 セットのフォワードプライマーの 3' 末端が T に置き換わったもの(N2F\_C20T)の流行がみられた。このミスマッチは検出感度を 10~100 倍低下させるものであり、一時 NIID-N2 のみでの運用では検出できない時期もあったが、オミクロン株への置き換わりが進み、このミスマッチを持つデルタ株は存在しなくなった。一方でオミクロン株の中でも N2F\_C20T のミスマッチを持つウイルスがみられるようになり、確実な検出のためには NIID-S2 セットとの併用が望ましい。また、プローブ領域のミスマッチは、マニュアル記載の反応条件では影響がないが、使用する PCR マスターミックスによっては検出できない場合もあるため注意が必要である。[白戸憲也、川瀬みゆき、柿崎正敏、松山州徳(インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター第 2 室)、富田有里子(インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター第 2 室)、竹田誠]

## 2. SARS-CoV-2 のウイルス分離とリアルタイム RT-PCR 法による検出の関連に関する研究

SARS-CoV-2 の検出はリアルタイム RT-PCR によるが、リアルタイム RT-PCR 法は検体中に存在する対象領域の遺伝子断片の有無を確認する試験であり、検体の感染性を直接検出する試験ではない。しかしながら、臨床的には特に退院確認時など、リアルタイム RT-PCR の結果から検体や患者の感染性を推測する必要性があり、様々な議論がなされていた。

SARS-CoV-2 はコロナウイルスであるため、複製の際にコードしているタンパク質とほぼ同数の subgenomic mRNA (sgmRNA)が作られる。sgmRNA は一番 5' 側にコードされているタンパク質のみが翻訳されるが、すべての sgmRNA は 3' 側に N 遺伝子配列を含むことになる。したがってコロナウイルス

検出系が構築される際は N 遺伝子が標的に選ばれることが多い。近年の研究で、通常の sgmRNA は転写調節因子(TRS)の制御下で合成される正規の sgmRNA(canonical sgmRNA)であるが、TRS の制御によらないランダムな sgmRNA(non-canonical sgmRNA)が数%存在することがわかってきた。しかし canonical sgmRNA が全体の 90%以上を占め、依然として N 遺伝子等の構造タンパク質領域を標的とする検出系のほうが検出率が高く、N 遺伝子の陽性は sgmRNA 存在、すなわちウイルス複製の形跡を示すことになり、ウイルスゲノム RNA の存在を示す可能性は低いとされる。そこでウイルスゲノム RNA を検出する可能性を上げるために ORF1a 遺伝子を標的とするプライマー・プローブセット(NIID-ORF1a)を開発し、VeroE6/TMPSS2 細胞を用いて、低コピー数の検体からのウイルス分離と併せて評価を行った。結果として、ウイルス分離が成功したのはすべて NIID-ORF1a 陽性を示す検体であり、NIID-ORF1a 陰性の検体からは分離されなかった。以上のことから遺伝子検査系を目的に応じて使い分けることが重要であり、NIID-ORF1a による検出はウイルス分離の可能性を示唆する指標となりうることを示された。[白戸憲也、川瀬みゆき、柿崎正敏、松山州徳(インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター第 2 室)、富田有里子(インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター第 2 室)、竹田誠]

## 3. 新型コロナウイルスにおける懸念される変異株 (VOCs) の性質解析

これまで日本で確認されている懸念される変異株 (Variants of Concern: VOCs) は、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株、オミクロン株である。これらの VOC の持つ変異が VOC の性質にどのような影響を与えているかを調べることは、今後発生し得る VOCs へ対応するために必須であると考えられる。そこで、本研究では、これまで本国で確認されている VOC の性質を解析することを目的とした。VOCs の増殖効率を比較するために、VeroE6/TMPRSS2 細胞と Calu-3 細胞を用いて増殖アッセイを行った。また、S タンパク質の開裂性を比較するために、S1 並びに S2 に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。S タンパク質の開裂性は、TMPRSS2 の利用能と密接に関係していることが報告されている。さらに、細胞侵入経路を検討するために、セリンプロテアーゼ阻害薬



である Nafamostat とカテプシン阻害薬である E-64d を用いて エントリーアッセイを行った。VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いた増殖アッセイでは、オミクロン株(BA.1)は他の VOC と比較して増殖効率が有意に低いことが明らかになった。また、ウエスタンブロットの結果から、武漢株と比較してアルファ株とオミクロン株(BA.1)は2倍の開裂性、デルタ株は3倍の開裂性であることが明らかになった。さらに、Nafamostat と E-64d を用いたエントリーアッセイでは、Calu-3 細胞において、オミクロン株(BA.1)のみがエンドサイトーシス経路を主として細胞侵入に使用していることが明らかになった。以上から、オミクロン株(BA.1)は、S タンパク質の開裂性の高い他の VOCs(アルファ株とデルタ株)とは異なり、S タンパク質の開裂性が向上しているにもかかわらず TMPRSS2 の利用能が低下しているという性質を持つことが明らかとなった。現在もオミクロン株のサブバリエーションが発生し続けていることを鑑みると、サブバリエーションを含め今後さらに詳細に解析を進めていく必要がある。[柿崎正敏、岩田(吉河)奈織子(感染病理部)、志和希(感染病理部)、大倉喬、田原舞乃、福士秀悦(ウイルス第一部)、前田健、川瀬みゆき、富田有里子(インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター)、高山郁代(インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター)、松山州徳(インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター)、白戸憲也、鈴木忠樹(感染病理部)、永田典代(感染病理部)、竹田誠]

#### 4. RS ウイルスグローバルサーベイランスのための基盤研究

WHO は、すでにある Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)の枠組みを利用して、RS ウイルスのグローバルサーベイランス活動を積極的に推進しようとしており、国際協力、国際協調の観点から、日本もその活動に対応していく必要がある。検査法としては米国 CDC の方法(リアルタイム RT-PCR による検出 Fry et al. 2010 PLoS one 5(11): e15098)(CDC 法①)が推奨され、2016-2018 年に行われていた 1st phase パイロットサーベイランスでは CDC法①が用いられていた。CDC 法①はサブグループ A, B に共通するプライマー・プローブを用いることで、両方を 1 つのセットで検出する方法である。サブグループは別途行う必要があった。一方、2019 年から始まった 2nd phase パイロットサーベイランスでは 1 組のプライマーと、A, B それぞれに特異的なプローブを用

いる方法(CDC法②)に変更された可能性があり、CDC法②の検証も行う必要が生じた。検出感度、特異性は特に問題ないと思われるが、CDC 法①との検出に齟齬がみられた。CDC 法②の開発の経緯として、サブグループ B に 2014 年頃から進化がみられ、既存の検出セットが対応できなくなっているという報告もあり、国内での検出例について、CDC法①の対象領域配列の経時的変化を解析した。確かに 2016 年頃からサブグループ B のウイルスの中でリバースプライマーの 3' 末端から 5 番目の塩基が T から C になるミスマッチをもつものが主流になっている。しかし点変異導入テンプレートをを用いて解析する限り、このミスマッチは感度に影響しないため、CDC 法①と②の間の感度差は別の原因と考えられた。患者検体におけるウイルス RNA コピー数の存在を模擬的に解析するため、ヒトプライマリ呼吸器上皮細胞の気相培養系でウイルスを複製させ、その気相面の細胞洗浄液を検体と見立てて次世代シーケンサーによる解析を行うと、CDC法②の検出領域のリード数が多いことがわかり、これらウイルスRNAの存在比が感度差になっていると想定される。従って CDC 法②を追記した検出マニュアルの改訂を進めている。[白戸憲也、川瀬みゆき、諏訪麗子、久米庸平(福島県立医科大学)、知識美奈(福島県立医科大学)、小野貴志(福島県立医科大学)、則藤桜子(福島県立医科大学)、佐藤晶論(福島県立医科大学)、橋本浩一(福島県立医科大学)、細矢光亮(福島県立医科大学)、岡本道子(仙台医療センター)、久間木悟(仙台医療センター)、永井幸夫(永井小児科医院)、西村秀一(仙台医療センター)、竹田誠]

#### 5. 小児入院患者検体を用いたリアルタイム PCR 法による他呼吸器ウイルス解析およびウイルス分離

RSウイルスのグローバルサーベイランスではリアルタイムPCRベースでウイルス検出を行う事になっている。対象は全年齢で、症例定義は急性呼吸器感染(ARI)、重症急性呼吸器感染(SARI)それぞれから発熱を引いたものである。また先進国にはRSウイルスのみならず、他呼吸器ウイルスについても感染を行い、それぞれの症例定義におけるウイルス検出割合を示すことも期待されている。本研究ではAMED研究班で同班の分担研究者である福島県立医科大学(橋本浩一准教授)で保管されている小児のSARI検体を用い、16種の呼吸器ウイルスについてリアルタイム PCR による検出を行った。R2 年度

は SARS-CoV-2 流行の影響のためか、RSV の流行がほとんど見られなかったが、R3 年度に大流行がみられている。検体は 2017-2021 年に採取されているが、RSV の存在比率は期間を通して全体の 3 割ほどであった。ついで多いのはライノウイルス、ヒトボカウイルスであった。インフルエンザウイルスおよび人メタニューモウイルスは SARS-CoV-2 発生以後は検出されなかった。これらの検査で陽性となったものを用い、ヒトプライマリ呼吸器上皮細胞の気相培養を用いてウイルス分離も行った。これまでに通常の株化培養細胞では分離が極めて困難であるヒトコロナウイルス、ヒトボカウイルスなどを分離し、次世代シーケンサーを用いて全長遺伝子配列を解析するとともに GenBank への登録を行っている。[白戸憲也、川瀬みゆき、諏訪麗子、柿崎正敏、久米庸平(福島県立医科大学)、知識美奈(福島県立医科大学)、小野貴志(福島県立医科大学)、則藤桜子(福島県立医科大学)、佐藤晶論(福島県立医科大学)、佐久間弘子(星総合病院)、鈴木重雄(大原総合病院)、橋本浩一(福島県立医科大学)、細矢光亮(福島県立医科大学)、竹田誠]

#### 6. 臨床検体からのヒトパラインフルエンザウイルス4分離とゲノム配列の解析

ヒトパラインフルエンザウイルス 4 (HPIV4) はパラミクソウイルス科 *Orthorubulavirus* 属に属する一本鎖のマイナス鎖 RNA ウイルスであり、肺炎や気管支炎を呈することもある小児の主な気道感染症原因ウイルスの一つである。これまでウイルス分離が困難であったことから登録されている HPIV4 ゲノム配列は少数であった。当室ではリアルタイム PCR により HPIV4 陽性と同定された小児入院患者の鼻咽頭スワブ検体から、ヒト気管支および気管上皮細胞の気液界面培養 (HBTEC-ALI) を用いてウイルス分離を行い、10 分離株のほぼ完全なゲノム配列を報告した。これらの内 3 検体は単感染で 7 検体は別の呼吸器ウイルスとの同時感染であった。臨床検体からの呼吸器ウイルス分離及びウイルスストック作製とゲノム情報の解析を行っている。[杉元聡子、諏訪麗子、川瀬みゆき、柿崎正敏、江川和孝、竹田誠、白戸憲也]

#### 7. アルファコロナウイルス NL63 のスパイク蛋白質に固有な領域の機能解析

アルファコロナウイルス NL63 の馴化株 Amsterdam1 は、ベータコロナウイルス SARS-CoV-2 と同様にヒト宿主細胞の ACE2 蛋白質をレセプターとし、HeLa/ACE2 細胞で増殖することが可能である。一方、NL63 の臨床分離株はこれまで HeLa/ACE2 細胞を含む培養細胞系を用いた増殖の成功例がなく、プライマリーヒト気管支上皮細胞の気相液相界面培養系(トランズウェルを用いた系)を用いる他に増殖の手段がない。NL63 と SARS-CoV-2 や他のヒトコロナウイルスのスパイク蛋白質のアミノ酸配列を比較すると、NL63 のスパイク蛋白質の N 末端には、他コロナウイルス種には存在しない固有の領域が存在する (Zhang et al. 2020 QRB Discovery 1: e11, 1-9)。この領域は、スパイク蛋白質の他領域と異なり、同定されている糖鎖修飾サイトが極端に少ないこと、また  $\beta$  シート構造を取り蛋白質表面に露出していることから、未知の宿主因子と結合する可能性が考えられた。そこで NL63 の馴化株 Amsterdam1 と臨床分離株 (Tokyo 株 3 種、Fukushima 株 7 種) についてスパイク蛋白質のアミノ酸配列を比較したところ、ドメイン 0 に臨床分離株特有のバリエーションが集中していることが分かった。これらのことから、当該領域がアルファコロナウイルス特有の因子と結合し、NL63 馴化株と臨床分離株の宿主選択制の違いに関与している可能性が考えられるため、検討を進めている。[後藤麻子・白戸憲也・竹田誠]

#### 8. ヒトボカウイルスが他の呼吸器系ウイルスと共感染する意義

ヒトボカウイルス (Human bocavirus: HBoV) は、2005 年にスウェーデンの呼吸器感染症患者の鼻咽頭液から分離された全長約 5.5kb の DNA ウイルスであり、パルボウイルス科パルボウイルス亜科ボカウイルス属に分類される。HBoV は、1 型から 4 型まで確認されており、特に 1 型 (HBoV1) は急性気道炎患者の鼻咽頭部の検体から検出される。HBoV1 が検出される呼吸器感染症の症例では、HBoV1 以外のウイルスが同時に検出されることが多く、HBoV1 が多くのウイルスと相互作用している可能性が考えられる。その頻度は報告によってばらつきはあるが、約半数の HBoV1 検出症例から HBoV1 以外のウイルスが同時に検出されている。そこで本研究では、生理的環境を再現する気相液相境界面 (Air-liquid interface: ALI) 培養法による in vitro 気道上皮培養モデルを用いて、HBoV1 が他の呼吸器系ウイルスと共感染する意義を解析することを目

的とした。これまでに、SARS-CoV-2 のデルタ株・オミクロン株 (BA.1) と共感染をさせ解析した。その結果、デルタ株との共感染では、デルタ株単独感染時と比較してウイルス増殖に差は見られなかった。一方、オミクロン株 (BA.1) との共感染では、オミクロン株 (BA.1) 単独感染時と比較してウイルス増殖が低下した。このことから、HBoV1 が共感染することでオミクロン株 (BA.1) の増殖に対して影響を与えることが明らかになった。今後は、HBoV1 がオミクロン株 (BA.1) の増殖に対して影響を与えるメカニズムを詳細に解析するとともに、他の呼吸器系ウイルスを用いて同様の解析を進める予定である。[柿崎正敏、杉元聡子(安全実験管理部)、川瀬みゆき、白戸憲也]

#### 9. 抗 SARS-CoV-2 薬剤の探索

脂質代謝に影響を与える約 30 種類の薬剤や化合物の抗 SARS-CoV-2 活性を解析した。その結果、核内受容体 PPAR  $\gamma$  を阻害する Ciglitazone が、SARS-CoV-2 に強い増殖阻害効果を発揮することが明らかとなった。また、SARS-CoV-2 と同じベータコロナウイルス ( $\beta$ -CoV) に属するヒトコロナウイルス HCoV-OC43 に対しても増殖阻害効果を示した。次に Ciglitazone 類縁化合物を約 10 種入手し、 $\beta$ -CoV 増殖阻害効果を解析したところ、同様の効果を示すものは無かった。Ciglitazone の作用は多岐にわたるため、その効果が脂質代謝への影響によるものであるかは、現在のところ不明である。今後、類縁化合物の結果と RNA 複製小胞形成への影響、ウイルス増殖の抑制点などの解析から、ciglitazone による  $\beta$ -CoV 増殖阻害機構を明らかにする予定である。[田原舞乃: 花田賢太郎(細胞化学部)、渡士幸一(治療薬・ワクチン開発研究センター)、竹田誠]

#### 10. コロナウイルスゲノム内に重複してコードされる疎水性アルファヘリックスペプチド群の機能解析

コロナウイルスの主要なウイルスタンパク質全ての ORF 領域に、コドンの読み枠を変えてアルファヘリックス構造を主体とした多数の疎水性ペプチド (hydrophobic alpha-helical peptide (HAHP)) がコードされていることを見出した。これらの HAHP は、transcription-regulating sequence (TRS) 非依存的に合成される non-canonical subgenomic RNA から翻訳される可能性がある。この HAHP の機能解析を行ったところ、+2 フレームに

おいて、コロナウイルスゲノム全体に多数の HAHP がコードされており、さらに、このゲノム特性は、HCoV、SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 だけでなくニドウイルス目の多くのウイルスに共通していることが判明した。また、HAHP の一つであるペプチド (2c と命名) と各ウイルスタンパク質を共発現させたところ、SARS-CoV-2、MERS-CoV の S タンパク質と特異的に共局在し、さらに S タンパク質による膜融合を特異的に抑制した。また、レプリコン細胞内で 2c を発現させると、SARS-CoV-2 RNA の合成をも抑制した。これらの結果より、コロナウイルスのゲノムには、主要なウイルスタンパク質以外にも機能的なタンパク質やペプチドが多数存在し、コロナウイルスの複製に参与している可能性が示唆された。現在、膜融合およびウイルス RNA 合成抑制メカニズムについて詳細に解析するとともに感染細胞内における HAHP の発現を確認している。[大倉喬、白戸和也、柿崎正敏、杉元聡子、松山州徳(インフルエンザ・呼吸器ウイルス研究センター)、田中智久(山梨大学)、久米庸平(福島県立医科大学)、知識美奈(福島県立医科大学)、小野貴志(福島県立医科大学)、森石恆司(山梨大学)、園山正史(群馬大学)、細矢光亮(福島県立医科大学)、橋本浩一(福島県立医科大学)、前仲勝実(北海道大学)、竹田誠]

#### 11. SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を発現する組換えパラミクソウイルスの開発

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) による世界的なパンデミックにより感染者・死亡者は依然増加し続けている。COVID-19 の原因ウイルスである SARS コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、ヒトに対して高い病原性と伝搬性を示すことから、BSL3 以上に対応していない研究施設では使用が制限されている。本研究では、SARS-CoV-2 を研究する上で高い安全性を保障するために、SARS-CoV-2 のスパイク (S) タンパク質のみを発現する組換えセンダイウイルス (rSeV) あるいは牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス (rBPIV3) を作製する。これら組換えパラミクソウイルス内のマトリックスタンパク質 (M) 遺伝子を欠損 ( $\Delta M$ ) させ、ウイルス粒子形成能を著しく低下あるいは消失させる。あるいは、青色光照射時にのみウイルスが増殖する光応答性機能を付与する。SARS-CoV-2-S (Wuhan 株) 全長あるいは Cytoplasmic tail を C 末端側から 19

アミノ酸欠損(SΔ19)させ、SeV-FのCTを付加したキメラスタンパク質(SΔ19-FCT)遺伝子をSeV-F、HN遺伝子と置換した完全長cDNAをそれぞれ作製したところ、リバースジェネティクス法によりSΔ19-FCT発現rSeVのみ作出することに成功した。このrSeVをVeroE6/TMPRSS2細胞に感染させたところ、培養上清中にウイルス粒子はほとんど放出されず、巨細胞を形成しながらcell-to-cell感染様式で増殖することが判明した。一方、BPiV3完全長cDNAの構築およびrBPiV3作製の系を新たに構築した。同様にS発現rBPiV3の作出も試みている。今後は、その他SARS-CoV-2のvariantのSを発現するrSeV、rBPiV3を作出し、SARS-CoV-2-Sに対する各種中和モノクローナル抗体からのエスケープミュータントを解析し、中和エピトープマッピングを行う予定である。[大倉喬、田原舞乃、大槻紀之、入江崇(広島大学)、坂口剛正(広島大学)、竹田誠]

## V. インフルエンザウイルスに関する研究

### 1. 一次標準抗原の不活化方法の評価

ワクチンの力価試験である一元放射免疫拡散(SRD)試験用標準抗原は、精製ウイルスである一次標準抗原(Primary Liquid Standard [PLS])を基準にHA含有量を制定する。PLSは作製段階でウイルスを不活化する必要があるが、ウイルス不活化とその手法の違いによるSRD試験への影響が懸念事項となる。

そこで、A(H1N1)pdm09およびA(H3N2)型ウイルスについて、不活化していない生PLS、ホルマリンで不活化したPLS、β-プロピオラクトン(BPL)で不活化したPLSを用い、PLS製造後0~4ヶ月でSDS-PAGEとSRD試験を行い、SDS-PAGEの泳動像や、PLS中のHA含量を経時的に測定することにより、不活化方法によるPLSの性状への影響を検証した。その結果、SDS-PAGEでは、ホルマリンで不活化したPLSにおいて、高分子領域に顕著に多くのバンドが検出された。これは、ホルマリンでの不活化が、より高頻度にウイルスタンパク質を凝集させるためではないかと考えられた。また、この現象は、0ヶ月の時点でも認められたが、時間の経過とともに、さらに助長される傾向にあり、4ヶ月では、SDS-PAGE上の総タンパク質に占めるHA含有率に影響が及ぶ場合もあった。SRD試験においては、解析に使用した全てのロットにおいて、生PLSと比較して、ホルマリン不活化PLSでは、HA含量がBPL不活化PLS

よりも低く、その差は時間の経過とともに大きくなる傾向が認められた。以上の結果から、PLSを不活化する際には、ホルマリンよりもBPLの方がPLSへの影響が軽微である可能性が示唆された。[桑原朋子、嶋崎典子、佐藤佳代子、原田勇一;中村一哉(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);板村繁之、赤堀ゆきこ、西嶋陽奈、村野けい子、竹田誠]

### 2. インフルエンザワクチンおよび新型コロナワクチン接種後の抗体応答と感染伝播、ならびに参照抗血清を用いた中和試験の標準化に関する研究

インフルエンザや新型コロナウイルス感染症(COVID-19)では、ワクチン接種者での抗体応答と感染伝播の関係は必ずしも完全には理解されておらず、さらにウイルス変異によるワクチン効果への影響についても同様である。特に、医療従事者にとっては、院内感染対策を行う上でワクチン効果として何が期待できるのか知ることは重要と思われる。

本研究では、2022年3月から、国内3施設(各施設の倫理承認済み)の、インフルエンザおよびCOVID-19に対するワクチンを1回以上接種した健康人で、任意で研究に参加した人を対象として、経時的に中和抗体価を測定している。また、参加者の中で、ブレイクスルー感染の事例が生じた場合には、任意でご提供頂く抗血清や検体中のウイルスのゲノム解析等の性状解析を行うことによって、ワクチンによる抗体応答やウイルスの感染伝播動態に関わる因子を探索している。

また、得られた抗血清の中から、変異ウイルスに対しても中和抗体価の高い抗血清を選択し、In-house参照抗血清の候補を作製して、中和抗体価の標準化を検討している。[嶋崎典子、板村繁之、浜本いつき、浅沼秀樹、長谷川秀樹、竹田誠;石井淳子(神戸市立医療センター中央市民病院);森裕紀子、関根麻理子、若杉安希乃、遠藤真理(北里大学 東洋医学総合研究所)]

### 3. 一元放射免疫拡散試験用抗血清作製のための抗原調製法の検討

インフルエンザHAワクチンの力価測定は、一元放射免疫拡散(SRD)試験により、抗原抗体反応による沈降輪を生じさせ、その面積を計測することで検体中のHA含有量を定量化している。それ故、精度の高い試験を実施するためには、明

瞭な沈降輪を形成する抗血清が必要になる。SRD 試験に使用する抗血清は、インフルエンザウイルスから精製した HA を免疫抗原とし、ヒツジに免疫して作製している。HA の精製方法として Triton-X を用いて HA をウイルス膜から抽出する方法 (Triton 法) や、Bromelain を用いて酵素的に HA のウイルス膜外領域を切離する方法 (Bromelain 法) などがある。B/Phuket/3073/2013 株を用いて抗原の調製方法により産生誘導される抗体の性状について検討した。その結果 Bromelain 法で精製した HA で免疫した抗血清では明瞭な沈降輪が形成されたのに対し、Triton 法で精製した HA では不明瞭な沈降輪が形成されるという結果を得、免疫抗原の精製法の違いにより産生誘導される抗体に質的違いがあることが明らかとなった。[佐藤佳代子、嶋崎典子;高橋仁(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);桑原朋子、原田勇一、竹田誠]

#### 4. 全粒子ワクチン、スプリットワクチンにより誘導される免疫応答のレバトア解析

全粒子ワクチンとスプリットワクチンにより産生誘導された抗体は質的に異なっていることをこれまでに報告してきたが、B細胞レバトア解析を行い、その詳細について解析を行なった。スプリットワクチンで免疫した場合と全粒子ワクチンの場合とではBCRVh遺伝子の多様性に違いがあるがわかった。[佐藤佳代子;築地信(星薬科大学)]

## VI. インフルエンザワクチンに関する研究

### 1. インフルエンザワクチン国家検定の見直し

現在、ワクチンの国家検定試験は、製造されるすべてのロットについて実施されているが、SLP の導入、製造所における GMP 導入など、ワクチンの品質向上が図られているため、国家検定の内容を見直し、全ロット検定の要否について検討が行われている。インフルエンザワクチンについても本見地に立ち、特に重要な力価 (SRD) 試験について、令和3年度を含む過去3年の検定成績から評価を行なった。検定成績と製造所の成績は概ねよく一致しており、過去のトレンドからも大きな乖離は認められなかった。しかしながら、標準品の安定性や、標準品と人的要因の複合的な問題などには未だ予測困難な部分が大いいため、引き続き年毎の試薬及び試験の確認作業

が必要であると示唆された。[原田勇一、嶋崎典子;中村一哉(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);板村繁之、竹田誠]

## サーベイランス業務

1. 令和2年度感染症流行予測調査における麻疹感受性調査結果を解析し、報告した。[大槻紀之、感染症疫学センター]
2. 令和3年度感染症流行予測調査における風疹感受性調査のため、標準血清 (HI 抗体陽性血清並びに陰性血清) を用意し、感染症疫学センターを通じて配布した。試験誤差の有無を検討するための事前確認検査用検体を整備・配布し、各施設で測定してもらい、その結果を集計した。令和2年度の調査結果を解析し、報告した[坂田真史、感染症疫学センター、森嘉生]
3. ヒトコロナウイルス OC43 に関する依頼検査を 1 件行った。[白戸憲也]
4. RSウイルスに関する依頼検査を1件行った。[白戸憲也]

## 品質管理に関する業務

1. 麻疹ワクチン中間段階 3 ロット、風しんワクチン中間段階 4 ロット、おたふくかぜワクチン中間段階 3 ロット、乾燥弱毒生麻疹ワクチン小分け製品 2 ロット、乾燥弱毒生風しんワクチン小分け製品 2 ロット、乾燥弱毒生麻疹風しん混合ワクチン 27 ロット、乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン小分け製品 31 ロットの検定を行った。[染谷健二、關文緒、田原舞乃、大倉喬、大槻紀之、中津祐一郎、坂田真史、森嘉生、久保田耐、加藤大志、加藤文博、若田愛加、竹田誠]
2. 人免疫グロブリン製剤 134 ロットの検定 (麻疹抗体測定試験) を行った。[關文緒、大槻紀之、田原舞乃、竹田誠]
3. 風疹抗体測定用体外診断用医薬品の承認前試験を 1 件実施した。[中津祐一郎、坂田真史、森嘉生、竹田誠]
4. 日本赤十字社から譲渡を受けた病原体陰性血漿 20 検体について風疹 IgG 抗体を含む種々の感染症抗原または抗体の測定を行い、感染症検体パネル候補を設定した [森嘉生、永井美智、竹田誠、国立感染症研究所感

染症検体パネル委員会]

5. インフルエンザ HA ワクチンの力価試験の精度管理及び規格確認

インフルエンザ HA ワクチンは毎年ワクチン株が見直しされるため、ワクチンの国家検定の力価試験として実施されている一元放射免疫拡散(SRD)試験の測定精度が一定の範囲内にあるように毎年確認して調整する必要がある。更に、平成 27 年度からの 4 価ワクチン導入にとまな、生物学的製剤基準の一部改正が実施され、B 型株の SRD 試験方法の実施区分が制定された。このような状況に対応するため、本年度の参照インフルエンザ HA ワクチン(含有ワクチン株:A/Victoria/1/2020 (IVR-217) (H1N1)pdm09、A/Tasmania/503/2020(IVR-221) (H3N2)、B/Phuket/3073/2013、B/Victoria/705/2018 (BVR-11)) を使用して SRD 試験の測定精度、また、各製造所の測定値との乖離についての検討を実施した。[原田勇一、嶋崎典子;中村一哉(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);桑原朋子、板村繁之、竹田誠]

6. 季節性インフルエンザワクチン製造用候補ウイルス株の品質管理試験の実

2022-23 年シーズンのインフルエンザワクチン製造用候補ウイルス A(H3N2)亜型 7 株、B 型 Victoria 系統 4 株について抗原分析を実施し、A(H3N2)亜型 7 株、B 型 Victoria 系統 5 株について HA、NA 遺伝子の遺伝子解析を実施して、遺伝的・抗原的安定性を解析し、ワクチン製造用株としての適性を確認した。また、インフルエンザワクチン製造用に試験交付及び仮交付された株の無菌試験を実施した。解析結果は、インフルエンザワクチン株選定のための検討会議等を通じて関係各機関と情報を共有した。[原田勇一、嶋崎典子、佐藤佳代子、桑原朋子、板村繁之、赤堀ゆきこ、西嶋陽奈、村野けい子、浅沼秀樹(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター)、竹田誠]

7. ワクチン国家検定

インフルエンザ HA ワクチン小分け製品 65 ロットの国家検定を行った。[原田勇一、嶋崎典子、佐藤佳代子、桑原朋子、村野けい子、板村繁之;中村一哉、白倉雅之、

鈴木康司、藤崎誠一郎、高山郁代、浜本いつき、高下恵美、高橋仁、有田知子、中内美名(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);竹田誠]

8. アストラゼネカ バキスゼブリア筋注の承認前検査を行った。[白戸憲也、松山州徳\*、竹田誠 \*インフルエンザ・呼吸器系ウイルスセンター第 2 室]

9. ヤンセンファーマ ジェコビデン筋注の承認前検査を行った。[柿崎正敏、白戸憲也、竹田誠]

10. ノババックス ヌバキソビッド筋注の承認前検査を行った。[柿崎正敏、白戸憲也、竹田誠]

11. アストラゼネカ バキスゼブリア筋注 80 ロットの検定を行った。[柿崎正敏、後藤麻子、中津祐一郎、加藤文博、白戸憲也、竹田誠]

レファレンス業務

1. 麻疹遺伝子検査に用いる遺伝子検査用参照 RNA を 3 ヶ所の地方衛生研究所に配布した。[山田裕加里、大槻紀之]

2. WHO による麻疹・風疹 IgM 検出ならびに麻疹・風疹ウイルス遺伝子検査の外部精度管理を受けた。[大槻紀之、山田裕加里、森嘉生、永井美智、竹田誠]

3. 風疹遺伝子検査に用いる参照 RNA を 4 カ所の地方衛生研究所等に配布した。[森嘉生、永井美智、竹田誠]

4. インフルエンザワクチンの力価測定用標準抗原国際キャリブレーション

WHO ERL として、ワクチンの力価測定用標準抗原に関する国際キャリブレーションを実施した。具体的には、A/Darwin/11/2021-cell (H3N2) [CBER]、A/Tasmania/503/2020(H3N2)\_cell [CBER]、A/Tasmania/503/2020 rHA [CBER]、A/Washington/19/2020 (H1N1)pdm09\_cell [CBER]、A/Wisconsin/588/2019(H1N1)pdm09\_rHA [CBER]、B/Michigan/01/2021 [CBER]、B/Michigan/01/2021 [NIBSC] (追加ロット)、B/Singapore/WUH4618/2021-cell [CBER]、B/Phuket/3073/2013 [NIBSC] (追加ロット)、B/Austria/1359417/2021 (BVR-26) [TGA]、A/Victoria/1/2020 (IVR-217) (H1N1)pdm09 [NIID]、A/Tasmania/503/2020 (IVR-221) (H3N2) [CBER]、

A/Tasmania/503/2020 (IVR-221) [NIBSC] (追加ロット)、A/Cambodia/e0826360/2020(IVR-224) [NIBSC]、A/Darwin/6/2021 (IVR-227) [TGA]、A/Darwin/9/2021 (IVR-228) [NIBSC]、A/Darwin/9/2021 (SAN-010) [CBER]について、新規ロットの標準インフルエンザ HA 抗原に含有される HA 抗原の含有量の設定を、英国、豪州、米国の生物製剤に関する国立試験研究機関である NIBSC、TGA、CBER と共同で実施した。[原田勇一、嶋崎典子、佐藤佳代子;中村一哉(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);桑原朋子、板村繁之、赤堀ゆきこ、西嶋陽奈、村野けい子、小栗麻帆、竹田誠]

5. インフルエンザ HA ワクチンの国家検定のための標準抗原・参照抗血清の作製

令和3年度のインフルエンザ HA ワクチンのワクチン製造株である A/Victoria/1/2020 (IVR-217) (H1N1)pdm09、A/Tasmania/503/2020 (IVR-221) (H3N2)、B/Phuket/3073/2013、B/Victoria/705/2018 (BVR-11) の4株について、国家検定の力価試験に使用する参照抗インフルエンザ HA 抗血清と標準インフルエンザ HA 抗原(一元放射免疫拡散試験用)を作製し、標準抗原に含有される HA 抗原の含有量、及び参照抗血清の至適濃度の設定を実施し、本年度国内標準品として制定した。また、B 型ウイルスの2株については、SRD 試験方法の評価研究結果に基づき、SRD 試験の実施区分を制定した。[原田勇一、嶋崎典子、佐藤佳代子;中村一哉(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);桑原朋子、板村繁之、村野けい子、小栗麻帆、竹田誠]

6. インフルエンザ HA ワクチンの国家検定のための参照インフルエンザ HA ワクチンの作製

国家検定の力価試験として一元放射免疫拡散(SRD)試験あるいは卵中和試験を行うこととされているが、通常は SRD 試験が力価試験として実施されている。SRD 試験で HA 含量が規定されたワクチンのマウスにおける免疫原性を確認することを主な目的として、卵中和試験に使用するウイルス株ごとに 15 μg/ドーズの HA 抗原を含有する参照インフルエンザ HA ワクチンを作製して

いる。本年度の参照ワクチンとして、令和3年度のワクチン製造株である A/Victoria/1/2020 (IVR-217) (H1N1)pdm09、A/Tasmania/503/2020(IVR-221) (H3N2)、B/Phuket/3073/2013、B/Victoria/705/2018 (BVR-11) の4株のワクチンを含有するものを作製した。参照ワクチンの作製に使用する原液について HA 価測定及び分画試験を実施して原液の品質規格を確認した。また、SRD 試験によって原液の HA 含量を測定して、ウイルス株ごとに 15 μg/ドーズの HA 抗原を含有する参照インフルエンザ HA ワクチンを調製した。得られた参照ワクチンについて、たん白質含量試験、マウス白血球数減少試験を実施して規格に適合していることを確認し、卵中和試験によってその力価を測定した。[原田勇一、嶋崎典子、佐藤佳代子、桑原朋子、板村繁之、村野けい子、小栗麻帆、浅沼秀樹(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);谷生道一、楠英樹、浜口功(血液・安全性研究部);持田恵子、蒲地一成、見理剛(細菌第二部);竹田誠]

7. 標準インフルエンザワクチン(CCA 用)の作製

標準インフルエンザワクチン(CCA 用)は毎年新規ロットを作製している。令和3年度は令和元年度に調製、納品された B/大阪/2/70 株を用いた原液ロットから、令和3年度用の標準インフルエンザワクチン(CCA 用)を調製し、ロット制定を行った。[佐藤佳代子;鈴木康司、岸田典子(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);桑原朋子、赤堀ゆきこ、西嶋陽奈、村野けい子、小栗麻帆、原田勇一、竹田誠]

8. SARS コロナウイルス 2 遺伝子検査用陽性コントロール RNA(N2 セット用)配布 国内 4 件

9. SARS コロナウイルス 2 遺伝子検査用陽性コントロール RNA(S2 セット用)配布 国内 45 件

10. MERS コロナウイルス遺伝子検査評価用 RNA 国内配布 1 件

11. RS ウイルス遺伝子検査用陽性コントロール RNA 配布 国内 2 件

12. RS ウイルス配布 国内 4 件

13. RS ウイルス RNA 配布 国内 1 件

14. ヒトコロナウイルス NL63 配布 国内 1 件

15. ヒトコロナウイルス OC43 配布 国内 1 件

み、PIVR 会議及び付随する技術的ワーキンググループに参加し、パンデミック対応に関する議論、研究結果の共有を行なった。[原田勇一;長谷川秀樹(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);竹田誠]

## 国際協力業務

1. 19th WHO Global Measles and Rubella Laboratory Network Meeting(2021年6月28日-7月2日、オンライン開催)に参加し、情報交換をおこなった。[竹田誠、森嘉生、大槻紀之]

6. 2021 APEC Online Communication Platform for COVID-19 Vaccine Testing Harmonization and Information Exchange of Batch Release Activity, online meeting オブザーバー参加 [白戸憲也] 2021年10月26日

2. Annual Atlanta Winter Summit of the WHO Global Measles Rubella Laboratory (2022年1月31日~2月11日、web開催)に参加し、WHO各地域における麻疹風疹の流行状況などについて情報収集を行うとともに意見交換を行った。[竹田誠、大槻紀之、森嘉生]

7. 第15回日中韓感染症フォーラム(オンライン) オブザーバー参加 [白戸憲也] 2021年12月9日~10日

3. インフルエンザワクチンの品質管理に関するWHO関連会議への出席と国際協力に関する協議、技術改良への参画:WHO ERLの一員として7月及び1月にweb会議として開催されたインフルエンザワクチンの品質管理に関する国際会議に出席し、技術改良にかかるERL間の共同研究結果を報告すると共に、ワクチンの品質管理における課題等について協議した。また、WHO主催によるワクチン製造所とERLを含む関係者の電話会議に参加して情報提供を行った。[原田勇一、嶋崎典子、佐藤佳代子、中村一哉、桑原朋子、板村繁之、赤堀ゆきこ、西嶋陽奈、村野けい子、小栗麻帆;長谷川秀樹(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);竹田誠]

## 研修業務

1. 地方衛生研究所所属の麻疹風疹検査担当者5名に風疹ウイルス遺伝子解析法の研修を実施した。[森嘉生、岡本貴世子(感染症危機管理研究センター)](2021年11月24日~11月26日)

2. 第372回ICD講習会において「新型コロナウイルスワクチンについて」の講演を行った。[白戸憲也] 2021年11月18日

4. WHO-ERL ID-MS法技術会議への参加  
細胞培養インフルエンザワクチンの国際標準抗原制定のため、WHO-ERL及び米国CDCの間で定期的で開催されているIsotope Dilution Mass Spectrometry (ID-MS)法技術会議(web会議)に参加し、試験成績の共有並びに技術的な議論を行った。[原田勇一、赤堀ゆきこ;長谷川秀樹(インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター);竹田誠]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

欧文発表

5. Pandemic Influenza Vaccine Response (PIVR)関連会議への出席と国際協力に関する協議、技術改良への参画  
インフルエンザパンデミックに対する国際共同研究として、WHOが主催するPIVRにERLの一員として取り組

1. Ichimura Y, Yamauchi M, Yoshida N, Miyano S, Komada K, Thandar MM, Tiwara S, Mita T, Hombhanje FW, Mori Y, Takeda M, Hachiya M. (2022) Effectiveness of immunization activities on measles and rubella immunity among individuals in East Sepik, Papua New Guinea: A cross-sectional study. *IJID Regions* 3:84-88, 2022.

2. Ikegame S, Hashiguchi T, Hung CT, Dobrindt K, Brennand KJ, Takeda M, Lee B: Fitness selection of hyperfusogenic measles virus F proteins associated with neuropathogenic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e2026027118, 2021.

3. Itsuki Hamamoto and Noriko Shimasaki. The Importance



- of Monitoring Viral Respiratory Infections During the COVID-19 Crisis. *J. Disaster Res.*, 17(1), p73-81, 2022.
4. Kakizaki M, Kume Y, Suwa R, Kawase M, Ono T, Chishiki M, Norito S, Sato M, Sakuma H, Suzuki S, Hosoya M, Takeda M, Hashimoto K, Shirato K: Thirteen nearly complete genome sequences of human bocavirus 1 isoated from pediatric inpatients in Fukushima, Japan. *Microbiol Resour Announc* 11:e0102721, 2022.
  5. Kanai M, Kamiya H, Okuno H, Sunagawa T, Tanaka-Taya K, Matsui T, Oishi K, Kitajima H, Takeda M, Mori Y: Epidemiology of congenital rubella syndrome related to the 2012-2013 rubella epidemic in Japan. *J Pediatric Infect Dis Sco* doi: 10.1093/jpids/piac043. Online ahead of print.
  6. Kato F, Nakatsu Y, Murano K, Wakata A, Kubota T, Hishiki T, Yamaji T, Kidokoro M, Katoh H, Takeda M. Antiviral activity of CD437 against mumps virus. *Front Microbiol* 12:751909, 2021.
  7. Kitai Y, Sato K, Shirato K, Ohmiya S, Watanabe O, Kisu T, Ota R, Takeda M, Kawakami K, Nishimura H: Variation in thermal stability among respiratory syncytial virus clinical isolates under non-freezing conditions. *Viruses* 14:679, 2022.
  8. Kitamura T, Bouakhasith V, Phounphenghack K, Pathammavong C, Xeuatvongsa A, Kobayashi A, Norizuki M, Okabayashi H, Miyano S, Mori Y, Takeda M, Sugiyama M, Mizokami M, Machida M, Hachiya M. Vaccine temperature management in Lao People's Democratic Republic: A nationwide cross-sectional study. *Heliyon*, 2021, 7, e07342.
  9. Kume Y, Hashimoto K, Chishiki M, Norito S, Suwa R, Ono T, Mochizuki I, Mashiyama F, Ishibashi N, Suzuki S, Sakuma H, Takahashi H, Takeda M, Shirato K, Hosoya M: Changes in virus detection in hospitalized children before and after the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pandemic. *Influenza Other Respir Viruses* 2022 Apr 29. doi: 10.1111/irv.12995. Online ahead of print.
  10. Kume Y, Hashimoto K, Shirato K, Norito S, Suwa R, Chishiki M, Ono T, Mashiyama F, Mochizuki I, Sato M, Ishibashi N, Suzuki S, Sakuma H, Takahashi H, Takeda M, Hosoya M: Epidemiological and clinical characteristics of infections with seasonal human coronavirus and respiratory syncytial virus in hospitalized children immediately before the coronavirus disease 2019 pandemic. *J Infect Chemother* 28:859-865, 2022.
  11. Nakayama E, Kato F, Tajima S, Ogawa S, Yan K, Takahashi K, Sato Y, Suzuki T, Kawai Y, Inagaki T, Taniguchi S, Le TT, Tang B, Prow NA, Uda A, Maeki T, Lim CK, Khromykh AA, Suhrbier A, Saijo M. (2021) Neuroinvasiveness of the MR766 strain of Zika virus in IFNAR-/- mice maps to prM residues conserved amongst African genotype viruses. *PLoS Pathog.* 17: e1009788.
  12. Okura T, Otomo H, Suzuki S, Ono Y, Taneno T, Oishi E. (2021) Efficacy of a novel in-ovo-attenuated live vaccine and recombinant vaccine against a very virulent infectious bursal disease virus in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1:0319.
  13. Ohashi H, Wang F, Stappenbeck F, Tsuchimoto K, Kobayashi C, Saso W, Kataoka M, Yamasaki M, Kuramochi K, Muramatsu M, Suzuki T, Sureau C, Takeda M, Wakita T, Parhami F, Watashi K: Identification of anti-severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Oxysterol derivatives in vitro. *Int J Mol Sci* 22:3163, 2021.
  14. Ohashi H, Watashi K, Saso W, Shionoya K, Iwanami S, Hirokawa T, Shirai T, Kanaya S, Ito Y, Kim KS, Nomura T, Suzuki T, Nishioka K, Ando S, Ejima K, Koizumi Y, Tanaka T, Aoki S, Kuramochi K, Suzuki T, Hashiguchi T, Maenaka K, Matano T, Muramatsu M, Saijo M, Aihara K, Iwami S, Takeda M, McKeating JA, Wakita T: Potential anti-COVID-19 agents, cepharanthine and nelfinavir, and their usage for combination treatment. *iScience*

- 24:102367, 2021.
15. Okemoto–Nakamura Y, Someya K, Yamaji T, Saito K, Takeda M, Hanada K. Poliovirus–nonsusceptible Vero cell line for the World Health Organization global action plan. *Sci Rep* 11:6746, 2021.
  16. Okura T, Otomo H, Taneno A, Oishi E. (2021) Replication kinetics of turkey herpesvirus in lymphoid organs and feather follicle epithelium in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 21:0247
  17. Okura T, Taneno A, Oishi E. (2021) Cell-to-cell transmission of turkey herpesvirus in chicken embryo cells via tunneling nanotubes. *Avian Diseases*, 65(3):335-339.
  18. Ryotaro Ota, Daichi Karasawa, Mizuki Oshima, Koichi Watashi, Noriko Shimasaki and Yoshinori Nishii. Asymmetric total synthesis of four bioactive lignans using donor–acceptor cyclopropanes and bioassay of (-)– and (+)–niranthin against hepatitis B and influenza viruses. *RSC Advances*, 2022, 12, 4635-4639.
  19. Saito M, Tsukagoshi H, Sada M, Sunagawa S, Shirai T, Okayama K, Sugai T, Tsugawa T, Hayashi Y, Ryo A, Takeda M, Kawashima H, Saruki N, Kimura H. Detailed evolutionary analyses of the F gene in the respiratory syncytial virus subgroup A. *Viruses*. 13:2525, 2021.
  20. Saso W, Yamasaki M, Nakakita S, Fukushi S, Tsuchimoto K, Watanabe N, Sriwilaijaroen N, Kanie O, Muramatsu M, Takahashi Y, Matano T, Takeda M, Suzuki Y, Watashi K: Significant role of host sialylated glycans in the infection and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *PLOS Pathog* 18:e1010590, 2022.
  21. Shionoya K, Yamasaki M, Iwanami S, Ito Y, Fukushi S, Ohashi H, Saso W, Tanaka T, Aoki S, Kuramochi K, Iwami S, Takahashi Y, Suzuki T, Muramatsu M, Takeda M, Wakita T, Watashi K: Mefloquine, a potent anti–severe acute respiratory syndrome–related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) drug as an entry inhibitor *in vitro*. *Front Microbiol* 12:651403, 2021.
  22. Shirato K, Kakizaki M, Tomita Y, Kawase M, Takeda M: Detection of the ORF1 gene is an indicator of the possible isolation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Pathogens* 11:302, 2022.
  23. Shirato K, Matsuyama S, Takeda M: Less frequent sequence mismatches in variants of concern (VOCs) of SARS-CoV-2 in the real–time RT–PCR assays developed by the National Institute of Infectious Diseases, Japan. *Jpn J Infect Dis* 75:96-101, 2022.
  24. Shirato K, Tomita Y, Katoh H, Yamada S, Fukushi S, Matsuyama S, Takeda M: Performance evaluation of real–time RT–PCR assays for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus–2 developed by the National Institute of Infectious Diseases, Japan. *Jpn J Infect Dis Online* ahead of print, DOI:10.7883/yoken.JJID.2020.1079, 2021.
  25. Sugimoto S, Kume Y, Suwa R, Kawase M, Kakizaki M, Egawa K, Ono T, Chishiki M, Okabe H, Norito S, Sato M, Sakuma H, Suzuki S, Hosoya M, Takeda M, Hashimoto K, Shirato K: Ten Nearly complete genome sequences of human orthorubulavirus 4 isolated from pediatric inpatients in Fukushima, Japan. *Microbiol Resour Announc* 9:e0041122, 2022.
  26. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Fujisaki S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Chiba S, Halfmann P, Nagai H, Saito M, Adachi E, Sullivan D, Pekosz A, Watanabe S, Maeda K, Imai M, Yotsuyanagi H, Mitsuya H, Ohmagari N, Takeda M, Hasegawa H, Kawaoka Y: Efficacy of antibodies and antivirals against a SARS-CoV-2 omicron variant. *N Engl J Med* 386:995-998, 2022.
  27. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Fujisaki S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Halfmann P, Watanabe S, Maeda K, Imai M, Mitsuya H, Ohmagari N, Takeda M, Hasegawa H, Kawaoka Y: Efficacy of antiviral

- agents against the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. *N Engl J Med* 386:1475-1477, 2022.
28. Takeda M: Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. *Microbiol Immunol* 66:15-23, 2022.
29. Tamura N, Sakai S, Martorell L, Colomé R, Mizuike A, Goto A, Ortigoza-Escobar JR, Hanada K. (2021) Intellectual-disability-associated mutations in the ceramide transport protein gene CERT1 lead to aberrant function and subcellular distribution. *J Biol Chem.* 297(5) 101338. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101338>
30. Tomita Y, Matsuyama S, Fukuhara H, Maenaka K, Kataoka H, Hashiguchi T, Takeda M: The physiological TMPRSS2 inhibitor HAI-2 alleviates SARS-CoV-2 infection. *J Virol* 95:e00434-21, 2021.
31. Tomita Y, Takeda M, Matsuyama S. (2021) The anti-influenza virus drug favipiravir has little effect on replication of SARS-CoV-2 in cultured cells. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e00020-21, 2021.
32. Yamamoto Y, Nakano S, Seki F, Shigeta Y, Ito S, Tokiwa H, Takeda M: Computational analysis reveals a critical point mutation in the N-terminal region of the signaling lymphocytic activation molecule responsible for the cross-species infection with canine distemper virus. *Molecules* 26:1262, 2021.
- 和文発表
1. 新井智、森野紗衣子、高梨さやか、三輪晴奈、奥山舞、林愛、北本理恵、多屋馨子、鈴木基、森嘉生、坂田真史、竹田誠 2020年度風疹感受性調査実施都道府県、2020年度感染症流行予測調査における風疹の予防接種状況および抗体保有状況(暫定結果). *病原微生物検出情報*. 43(1):9-11
2. 加藤大志 (2021) パラミクソウイルスのRNA合成におけるシャペロンタンパク質の役割 *生体の科学* 72(4): 344-347.
3. 加藤大志 (2021) ムンプスウイルス増殖に関わる宿主因子の機能解析 *ウイルス* 71(1): 71-78
4. 嶋崎典子 ウイルス性呼吸器感染症の基礎知識と感染対策、クリーンテクノロジー, 31(6):39-44(2021).
5. 白戸憲也 SARS-CoV-2 検出法(感染研法)の現状と変異ウイルス(variant of concern, VOC)への対応力 *病原微生物検出情報(IASR) Vol.42* 2021年7月号 p143-145。
6. 白戸憲也 ヒトのコロナウイルスについて。臨床とウイルス 2021年 Vol.49 No. 4 p185-191。(臨床ウイルス学会)
7. 染谷健二、大槻紀之、竹田誠 (2021) 海外の麻疹 2020年の流行状況について *病原微生物検出情報* 42:183-184
8. 明神翔太、庄司健介、梅原永能、金子佳代子、安岡圭子、森嘉生、多屋馨子 (2022) 妊娠中に風疹 IgM 抗体陽性であったが風疹 HI 抗体、風疹 IgG 抗体陰性であった症例について *病原微生物検出情報*. 43(1):7-9
9. 竹田誠 SARS-CoV-2 のウイルス学 *周産期医学* 51:319-317, 2021
10. 竹田誠 海外における新型コロナワクチンの開発-世界の治験状況と展望 *感染と抗菌薬* 24:200-206, 2021
11. 竹田誠 パンデミック感染症としての COVID-19 と SARS-CoV-2 の特性 *病理と臨床* 39:1182-1189, 2021
12. 竹田誠 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の特性、変異ウイルスの出現 *JBSA Newsletter* 11:42-50, 2021
13. 竹田誠 SARS-CoV-2 とヒトコロナウイルスのウイルス学的特徴 *小児内科* 54:12-17, 2022.
14. 田原舞乃、竹田誠 麻疹ウイルスベクターワクチン *医学のあゆみ* 279:1010-1014, 2021
15. 田原舞乃、竹田誠 (2021) 麻疹ウイルスを創る *医学のあゆみ* 280:905-910, 2021
16. 田原舞乃、竹田誠 (2021) Reverse genetics:2) 麻疹ウイルス *臨床とウイルス* 50:53-59, 2022
17. 多屋馨子、森野紗衣子、新井智、鈴木基、大槻紀之、竹田誠、2020年度麻しん感受性調査実施道府県 (2021) 麻疹の抗体保有状況-2020年度感染症流行予測調査(暫定結果) *病原微生物検出情報* 42:181-182

## II. 学会発表

### 国際学会

1. Takeda M: Are emerging infections caused by morbilliviruses a potential or real threat to humans? The Neo-Virology Symposium. The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFII) @ Awaji Island, Hyogo, Japan, September 28-September 30, 2021

### 国内学会

1. 白戸憲也 国立感染症研究所における SARS-CoV-2 検出法開発の経緯と最近の話題 第95回日本感染症学会学術講演会/第69回日本化学療法学会総会 合同学会 スポンサーセミナー24 (共催:サーモフィッシュャーサイエンティフィック) 2021年5月7-9日 (オンライン公開5月17日-6月18日)
2. 久米庸平, 橋本浩一, 竹田誠, 佐藤晶論, 細矢光亮 小児入院患者における季節性コロナウイルスとRSV感染症の臨床的特徴 第62回日本臨床ウイルス学会 オンライン開催, 2021年6月12-13日
3. 白戸憲也 ヒトのコロナウイルスについて, 第62回日本臨床ウイルス学会 シンポジウム2「風邪のコロナウイルスと小児のCOVID-19-インフルエンザを含めて」 2021年6月13日
4. 知識美奈, 橋本浩一, 久米庸平, 小野貴志, 鈴木重雄, 佐久間弘子, 佐藤晶論, 竹田誠, 細矢光亮 COVID-19 拡大下における福島県でのRSウイルス検出状況 第53回日本小児感染症学会学術集会 京王プラザホテル (東京), 2021年10月9-10日
5. 久米庸平, 橋本浩一, 知識美奈, 佐久間弘子, 増山郁, 鈴木重雄, 竹田誠, 佐藤晶論, 細矢光亮 SARS-CoV-2 流行前の福島県における季節性コロナウイルスとRSV感染症の臨床的特徴 第53回日本小児感染症学会学術集会 京王プラザホテル (東京), 2021年10月9-10日
6. 竹田誠 SARS-CoV-2と宿主プロテアーゼによる活性化 第68回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場

(ハイブリッド開催), 2021年11月16-18日

7. 若田愛加, 加藤文博, 劉亜軽, 加藤大志, 竹田誠 核小体タンパク質である Treacle はムンプスウイルスの効率的な増殖に寄与する 第68回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (ハイブリッド開催), 2021年11月16-18日
8. 森嘉生, 坂田真史, 岡本徹, 中津祐一郎, 田鉦修平, 大槻紀之, 松浦善治, 竹田誠 Sphingomyelin Synthase 1欠損細胞において風疹ウイルスの侵入は hemifusion 状態で停止する 第68回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (ハイブリッド開催), 2021年11月16-18日
9. 嶋崎典子, 大嶋美月, 渡士幸一, 信澤枝里, 竹田誠, 太田凌太郎, 西井良典 植物由来成分の鏡像異性体を用いた抗ウイルス活性の評価 第68回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (ハイブリッド開催), 2021年11月16-18日
10. Liu Y, Katoh H, Sekizuka T, Wakata A, Bae C, Kato F, Takeda M: Search for host factors involved in the late stages of mumps virus propagation. 第68回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (ハイブリッド開催), 2021年11月16-18日
11. 塩野谷果歩, 山崎雅子, 岩波翔也, 伊藤悠介, 福士秀悦, 大橋啓史, 佐宗若菜, 田中智博, 青木伸, 倉持幸司, 岩見真吾, 高橋宜聖, 鈴木忠樹, 村松正道, 竹田誠, 脇田隆宇, 渡士幸一 抗マラリア薬メフロキンの強力な新型コロナウイルス感染阻害活性 第68回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (ハイブリッド開催), 2021年11月16-18日
12. 直亨則, 七種美和子, 佐藤光, 関塚剛史, 宇宿秀三, 田中伸子, 西村秀一, 竹田誠 近年のHMPVの分子進化とA2亜型の細分類 第68回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場 (ハイブリッド開催), 2021年11月16-18日
13. 坂田真史, 中津祐一郎, 加藤文博, 大槻紀之, 竹田誠, 森嘉生 哺乳類細胞遺伝子発現ベクターを用いた風疹

## ウイルス第三部

ウイルスリバーシジェネティクス系の構築 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場(ハイブリッド開催), 2021 年 11 月 16-18 日

感染症研究の今後を考える ウェブ開催 2021 年 8 月 20 日

14. 大橋啓史, Feng Wang, Frank Stappenbeck, 土本佳奈, 小林ちさ, 佐宗若奈, 片岡紀代, 山崎雅子, 倉持幸司, 村松正道, 鈴木忠樹, Camille Sureau, 竹田誠, 脇田隆字, Farhad Parhami, 渡士幸一 新型コロナウイルスの RNA 複製を阻害する新規酸化ステロールの同定 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場(ハイブリッド開催), 2021 年 11 月 16-18 日

2. 竹田誠 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の特性、変異ウイルスの出現 第 7 回バイオセーフティシンポジウム ウェブ開催 2021 年 9 月 16 日

15. 中嶋章悟, 大橋啓史, 竹田誠, 豊田哲也, 渡士幸一 新型コロナウイルス感染細胞実験を用いたハイスループット化合物スクリーニング系の構築 第 44 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜, 2021 年 12 月 1-3 日

16. 加藤文博, 中津祐一郎, 関塚剛史, 山地俊之, 劉亜軽, 斐彩元, 若田愛加, 久保田耐, 加藤大志, 竹田誠 ウィルス-宿主インタラクトーム解析を元にした抗パラミクソウイルス化合物の探索と性状解析、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜、2021 年 12 月 1-3 日

17. 佐藤佳代子, 嶋崎典子, 高橋仁, 桑原朋子, 原田勇一, 竹田誠 異なる精製法により調整した免疫抗原により誘導された抗血清の質的違い 第 25 回日本ワクチン学会学術集会 軽井沢プリンスホテル, 2021 年 12 月 3-5

18. Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Makoto Tsuji Evaluation of immune responses induced by influenza vaccines using antibody repertoire analysis 第 50 回日本免疫学会学術集会(2021 年 12 月、奈良)

19. 嶋崎典子 感染対策としてのマスクに関する解説とワクチン国家検定の基礎知識、防菌防黴学会 第 37 回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム、2022 年 3 月.

### 1. III. その他

1. 竹田誠 新型コロナウイルスの感染機構の理解とコロナ対応への応用 COVID 特別シンポジウム 本邦における